

03/41379

4

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

## ⑫ 公開特許公報(A) 平1-245159

⑬ Int.Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成1年(1989)9月29日

G 01 N 33/569  
// A 61 K 39/17L-7906-2G  
8829-4C

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全4頁)

⑮ 発明の名称 ニューカッスル病ウイルス抗体の検出用プレート及び抗原ウイルス  
の可溶化方法

⑯ 特 願 昭63-73920

⑰ 出 願 昭63(1988)3月28日

⑱ 発 明 者 水 村 芳 弘 岐阜県岐阜市折立296番地1 株式会社ゲン・コーボレー  
ション内⑲ 発 明 者 松 久 和 乃 岐阜県岐阜市折立296番地1 株式会社ゲン・コーボレー  
ション内

⑳ 出 願 人 株式会社ゲン・コーボレーション 岐阜県岐阜市折立296番地1

㉑ 代 理 人 弁理士 恩田 博宣

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

ニューカッスル病ウイルス抗体の検出用プレート  
及び抗原ウイルスの可溶化方法

## 2. 特許請求の範囲

1. プレートに形成された複数個のウェルを、  
オクチルグルコシド溶液処理で可溶化したニュー  
カッスル病ウイルス粒子溶液でコーティングした  
ことを特徴とするニューカッスル病ウイルス抗体  
の検出用プレート。2. 精製されたニューカッスル病ウイルス粒子  
をオクチルグルコシド溶液で処理して可溶化する  
ことを特徴とする抗原ウイルスの可溶化方法。

## 3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は酵素免疫測定法(以下ELISAと略  
称する。)によるニューカッスル病の診断に使用  
するニューカッスル病ウイルス抗体の検出用プレ  
ート及び抗原ウイルスの可溶化方法に関するもの  
である。

(従来の技術)

ELISAは①他の血清反応よりも感度が高い、  
②迅速に結果が得られる、③手技が簡単で自動化  
に適している、④一度に多数の検体処理が可能で  
ある、⑤抗体の力価測定に検体の限界希釈の代わ  
りに1点希釈の吸光度(OD値)で代用できる、  
などの利点から、ウィルス性疾病、細菌性疾病な  
どの各種疾病についてその診断への応用が試みら  
れている。そして、一般にELISAの特異性及  
び感度は固相化される抗原によって左右されるの  
で、抗原作製法はELISAの最も重要なポイント  
になる。従来、ニューカッスル病の診断についてもEL  
ISAの適用が検討されており、ELISAの抗  
原作製法として、ニューカッスル病ウイルス(以  
下NDVと略称する。)を接種した発育鶏卵の尿  
膜腔液そのものを抗原とする方法、これから精製  
したウィルスを熱又はホルマリンで不活化して抗  
原とする方法などがある。(Vet. Bull. 56,  
337~343(1986))

(本発明が解決しようとする課題)

NDVは感染力が強く、ときには人間にも感染して軽い結膜炎の症状を現わすので、生きたNDVを抗原としてELISAに使用する場合にはその取扱いが面倒になる。

一方、NDVを熱又はホルマリン処理で不活化した場合には、ウィルスの抗体との結合に関与する部分が変性して抗体との結合性が低下する。従って、ELISA用抗原として使用する際には、固相化するウィルスの量を多く必要とするという問題がある。

又、ウィルスの不活化方法としてノニデットP-40、トライトンX-100(いずれも商品名)などの界面活性剤を用いてウィルスを可溶化する方法も知られているが、これらを用いて可溶化したNDVをELISAの抗原として使用した場合には、その感度が低下するという問題がある。

又、ELISAにおいては、固相に対する抗原の結合状態のバラツキが測定結果の正確性を左右する重要な因子となる。従って、養鶏場等で多量

の検体をELISAで処理する場合、固相に対する抗原の結合作業(コーティング処理)からELISAの析式を行うことは、作業に時間がかかるばかりでなく測定結果にバラツキを生ずる原因となる。

本発明は従来技術の有するこのような問題点に鑑みてなされたものであり、その目的は抗体に対する結合能が低下することなく不活化された安全なNDV抗原が固相化されたELISA用プレートを提供することであり、さらには、抗体に対する結合能を低下させることなくNDVを不活化する方法を提供することである。

(課題を解決するための手段及び作用)

前記の目的を達成するため、本発明はELISAによるニューカッスル病診断に使用するニューカッスル病ウィルス抗体の検出用プレートとして、プレートに形成された複数箇のウェルを、オクチルグルコシド溶液処理で可溶化したニューカッスル病ウィルス粒子溶液でコーティングした。

又、精製されたニューカッスル病ウィルス粒子

をオクチルグルコシド溶液で処理して可溶化することにより、NDVの抗体に対する結合能を低下させることなくNDVが不活化される。

精製NDV粒子は、NDVを接種した発育鶏卵から採取した尿膜腔液を遠心分離して得た上清を、ショ糖密度勾配遠心にかけて後、PBS(リン酸緩衝液)に再浮遊して超遠心にかけることにより得られる。NDV粒子の可溶化は、NDV粒子をPBSに浮遊させた溶液に、オクチルグルコシドのPBS溶液を加えることにより室温で行われる。可溶化されたNDVのHA活性(赤血球凝集性)は精製NDVよりも多くなり、従来の不活化と異なり抗体に対する結合能の低下はない。これは第1図に示すように、NDVはその外膜(エンベロープ)1に抗原2が多量存在しており、可溶化していないNDVを固相化した場合には、第2図に示すようにプレート3と対応する側の抗原2が抗体との結合に関与できなくなるのに対し、本発明による可溶化ではNDVの外膜1が第1図のX印部分で切断されることにより、プレート3に固相

化された際、多くの抗原2が抗体との結合に関与できるようになるためと考えられる。

可溶化されたNDV粒子溶液をコーティングするプレートは、ELISAで一般に使用されるプレートが使用される。コーティングに使用する可溶化NDV粒子溶液は、HA活性(赤血球凝集性)が1:30~50となるように緩衝液で希釈調整して使用する(実用化の点では安定的に反応を促進するため100HAとする。)

(実施例)

以下、本発明についてより具体的に説明する。

#### (1) NDVの精製

NDVを10~11日齢の発育鶏卵に接種し、24~48時間後に尿膜腔液を採取した。細胞成分除去のため8000~10000gで2時間遠心し、その上清を100000gで2時間遠心してペレット状の沈澱物を回収した。この沈澱物をPBSに浮遊し、この浮遊液を20%及び50%の不連続密度勾配を有するショ糖溶液層上に重層して100000gで90分遠心した。20%と

50%の間のバンドを採取して5倍量のPBSに再浮遊し、さらに連続密度でショ糖密度勾配遠心(20~50%、100000g、1時間)を行なった。50%領域に近い部分に生じたバンドを採取し、ショ糖除去のためPBSに再浮遊して100000gで1時間遠心を行った。ペレット状の沈降物を回収し、PBSに浮遊後液体窒素中に保存した。この精製ウィルスのHA活性は1:2000以上、タンパク量は1000HA/μl当たり100μg以下であった。

#### (2) 精製NDV粒子の可溶化

精製NDV粒子を浮遊したPBS溶液に4%オクチルグルコシド液を等量加え、室温で1時間放置することによりNDV粒子を可溶化した。

比較試験として0.1%のトライトンX-100及びノニデットP-40(いずれも非イオン性界面活性剤の商品名)で、NDV粒子を可溶化した。

精製NDV、オクチルグルコシドによる可溶化NDV、トライトンX-100による可溶化NDV、ノニデットP-40による可溶化NDVについて、0.5%鶏赤血球液を使用して一般的に用いられるmicro法に従って赤血球凝集(HA)試験を2倍希釈法で行った。又、抗原中に残留する可溶化物質の溶血性試験をも行った。結果を表に示す。

抗原	HA活性	溶血活性
精製NDV	2 <sup>3</sup>	< 2 <sup>1</sup>
オクチルグルコシド 処理NDV	2 <sup>11</sup>	2 <sup>2</sup>
トライトンX-100 処理NDV	< 2 <sup>6</sup>	2 <sup>6</sup>
ノニデットP-40 処理NDV	< 2 <sup>6</sup>	2 <sup>6</sup>

抗体との結合能を表すHA活性は、オクチルグルコシド処理NDVでは精製NDVより2<sup>3</sup>高くなったのに対して、トライトンX-100処理NDV及びノニデットP-40処理NDVでは精製NDVより2<sup>2</sup>以上低くなった。

NDVより2<sup>2</sup>以上低くなった。

#### (3) 可溶化処理NDVのコーティング

オクチルグルコシドで処理した可溶化NDVを透析ののち溶液(HA活性1:16000以上)を炭酸緩衝液(pH9.6、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.02%含有)でHA活性1:100となるように希釈調整したものをコーティング用液とした。一般のELISA用プレートと同様に多数(例えば96個)のウェルを有するプレートの各ウェルに、前記コーティング用液を100μlずつ入れ、4℃で48時間放置した。コーティング用液を捨て、1%アルブミン加PBSを100μlずつ各ウェルに入れ、37℃で30分反応させた。次に0.1%トウィーン20加PBSで各ウェルを2回洗浄した後、プレートをよく乾燥した。コーティング後のプレートは4℃では長期保存後も標準陽性血清に対するELISAのOD値は0.5前後を保持したが、37℃では1週間で0.2まで低下した。すなわち、プレートの保存は低温(4℃)で行う必要がある。

(4) ELISAのOD値と中和抗体価との関係  
前記のようにして可溶化NDV抗原をコーティングしたプレートを使用するとともに、酵素標識抗体としベルオキシダーゼで標識したウサギ抗ニフトリIgGを使用して定法に従いELISAを行った。又、定法に従い赤血球凝集抑制(HI)試験及び中和試験を行った。

次式で定義するS/P比とHI価及び中和指数の相関性はいずれもr=0.7であった。

$$S/P比 = (S - N) / (P - N)$$

S—直接血清OD値、N—対照陰性血清OD値、  
P—対照陽性血清OD値

#### (発明の効果)

以上詳述したように本発明のプレートは、NDVの抗体に対する結合能が低下することなく不活化されて、各ウェルに抗原として結合されているので安全かつ簡単にELISAを行うことができ、作業者が異なっても測定結果のバラツキが小さくなる。又、可溶化処理によりELISA抗原として精製NDVより高感度となるため、結果的に感

相化に必要な抗原の量が少なくて済み製造コストが低くなる。

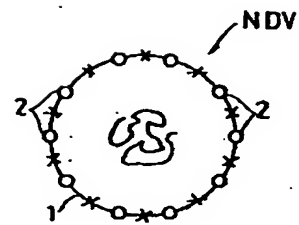
#### 4. 図面の簡単な説明

第1図はニューカッスルウィルスの模式図、第2図はニューカッスルウィルスを図相に付着させた状態を示す概略図である。

外膜(エンベロープ)1、抗原2、プレート3。

特許出願人 株式会社ゲン・コーポレーション  
代理人 弁理士 恩田 博宣

### 第1図



### 第2図

